

¿Es su preparación de muestras suficientemente buena?

Lípidos y peligros ocultos de una eliminación de matriz deficiente

Introducción

A lo largo de los años, habrá ido refinando el flujo de trabajo de su laboratorio para que sea lo más práctico y eficiente posible. La precipitación de proteínas (PPT) para la preparación de muestras biológicas y los flujos de trabajo QuEChERS para la preparación de muestras alimentarias son buenos ejemplos de cómo llevar a cabo la preparación de muestras complejas mediante planteamientos sencillos. Si le pidieran que describiera su flujo de trabajo actual, es muy probable que dijera que es lo suficientemente bueno para realizar los análisis en cuestión. Sin embargo, ¿es suficientemente buena esta estrategia de preparación de muestras?

El flujo de trabajo de su laboratorio debe afrontar numerosos desafíos, sin olvidar la necesidad constante de mejorar la eficiencia o la productividad. Un flujo de trabajo habitual comprende etapas de recogida de muestras, preparación de muestras, introducción en el instrumento, análisis, revisión de datos y, por último, generación de informes de datos; de todas ellas, siempre se ha considerado que la preparación de muestras es la que actúa como “cuello de botella” y limita la velocidad. Los avanzados instrumentos actuales incrementan enormemente la capacidad de analizar diversas muestras, teniendo en cuenta la sensibilidad, selectividad y fiabilidad requeridas, así como la viabilidad del análisis de muestras complejas. En consecuencia, se ha actuado sobre la etapa de preparación de muestras con el fin de reducir el tiempo, los costes y la complejidad, y de mejorar la aplicabilidad universal; podría decirse que se ha conseguido que sea suficientemente buena.

El flujo de trabajo más importante es el suyo. Una preparación de muestras deficiente conlleva diversos peligros ocultos, como pérdida de tiempo, problemas de mantenimiento y averías de los instrumentos y obtención de datos inexactos, que pueden materializarse y afectar a los resultados de su empresa. Estos peligros ocultos se pueden eliminar o minimizar en gran medida mediante la aplicación de estrategias adecuadas al flujo de trabajo de preparación de muestras. Esta mejora se puede conseguir sin necesidad de volver a formar a los científicos, realizar grandes inversiones de capital ni reescribir los procedimientos operativos estandarizados (SOP).

En este libro blanco se describen algunas de las interferencias conocidas de las muestras con las que se enfrenta a diario y se identifican algunos obstáculos ocultos quizás menos conocidos que podrían aparecer si no optimiza la eliminación de matriz en su flujo de trabajo de preparación de muestras. Además de informarle sobre las consecuencias (conocidas y desconocidas), se le presentará una solución novedosa para incrementar la productividad, mejorar la eficiencia de los técnicos y reducir el riesgo de contaminación de su instrumentación analítica. Esto puede ayudarle a mejorar la recuperación y la reproducibilidad sin tener que cambiar drásticamente sus SOP, reducir la productividad o añadir complejidad a su flujo de trabajo. Esa debería ser su definición de una preparación de muestras suficientemente buena.

¿Por qué se realiza la limpieza de muestras?

Hay dos motivos principales para realizar la preparación de muestras:

- Eliminar la matriz indeseada.
- Concentrar los analitos de interés.

En este libro blanco se examinan los riesgos evidentes y menos evidentes de no realizar las tareas de eliminación de matriz del modo más eficiente posible.

Los componentes indeseados de la matriz, si no se consideran o eliminan lo suficiente, pueden contaminar la ruta de flujo. Para el análisis por GC, GC/MS y GC/MS/MS, las sustancias no volátiles de la matriz extraídas simultáneamente pueden afectar a componentes de la ruta de flujo de GC como el inyector, el sello de oro y la columna (Figura 1). Para el análisis por LC, LC/MS y LC/MS/MS,



Figura 1. Contaminación de componentes de un sistema GC producida por una rutina de preparación de muestras "suficientemente buena".

las partículas y las sales de la matriz pueden dañar la válvula, el filtro en línea y la columna LC. Las sustancias extraídas simultáneamente de la matriz pueden aumentar la supresión iónica en la fuente de MS (Figura 2) y afectar a la fiabilidad del método. Aunque la mayoría de los químicos analistas filtran las muestras antes de inyectarlas en los sistemas de flujo con el fin de evitar los peligros conocidos e indicados anteriormente (y la filtración es una técnica excelente para minimizar los efectos de las partículas de la matriz), ¿qué sucede con la matriz indeseada que está disuelta? ¿Dónde acaba si la muestra solamente se filtra?

En la Figura 2 se puede apreciar que, si no se eliminan las sustancias disueltas indeseadas extraídas simultáneamente de la matriz (como sales disueltas, pigmentos, proteínas, lípidos, etc.), eso puede perjudicar al hardware analítico.

Debido a su elevada sensibilidad y selectividad, la espectrometría de masas

es el método analítico de referencia para un amplio rango de aplicaciones. No obstante, la supresión iónica o el incremento iónico provocados por los componentes de la matriz afectan negativamente a la exactitud, la precisión y la robustez, como indican los elevados valores de desviación estándar relativa (RSD). La infusión posterior a la columna es una técnica que identifica la supresión iónica o el incremento iónico provocados por la matriz. En la Figura 3 se muestra una configuración típica de dicho experimento (consulte la nota de aplicación 5991-8007EN³).

Si realizara este estudio comparativo, es posible que observara que su preparación de muestras "suficientemente buena" no era tan eficiente como desearía. La solución de preparación de muestras de Agilent puede ayudarle a que su preparación de muestras "suficientemente buena" resulte más eficiente y fiable.

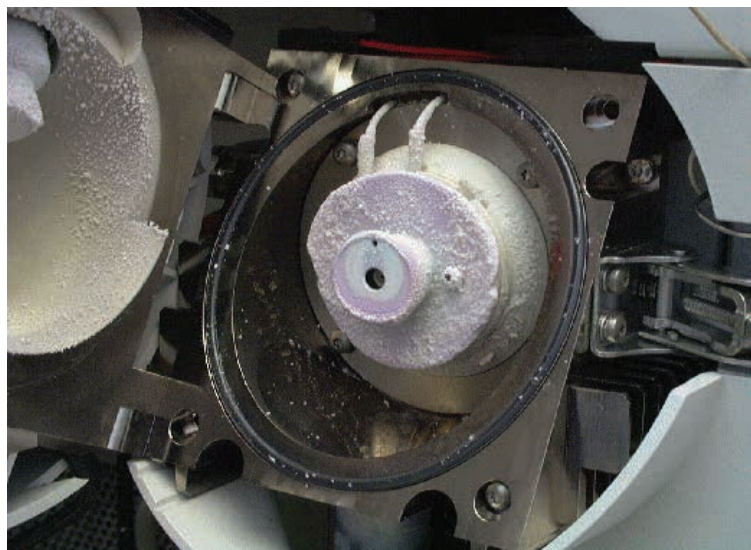


Figura 2. Acumulación salina en una fuente de iones LC/MS debido a las sales que no consiguió eliminar una rutina de preparación de muestras "suficientemente buena".

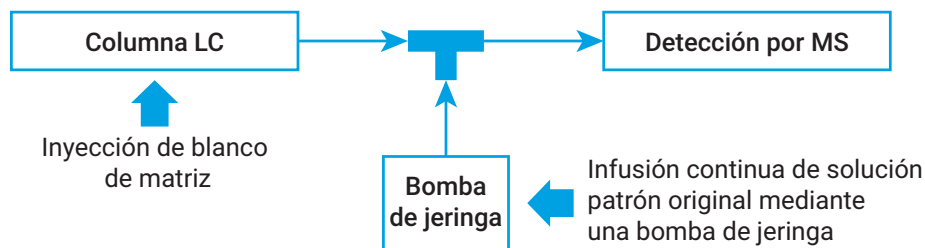


Figura 3. Diagrama de configuración estándar del experimento de infusión posterior a la columna para un estudio de evaluación y comparación de la supresión iónica de la matriz.

¿Cómo de graves son los efectos de los lípidos?

De todas las sustancias extraídas simultáneamente de la matriz de la muestra, es posible que los componentes más complejos (y, a menudo, pasados por alto) sean los lípidos, debido a la dificultad que supone eliminarlos de forma eficiente y también por la invisibilidad física de su acumulación. Utilizando un experimento de infusión posterior a la columna (con la configuración que se muestra en la Figura 3), se pueden evaluar los efectos de la matriz (por ejemplo, del suero o el plasma) en la señal MS mediante la infusión continua de blanco de matriz. Cualquier variación de la intensidad de la señal podría indicar la presencia de sustancias procedentes de la matriz que provocan supresión iónica o incremento iónico.

Los ejemplos (las zonas 2 y 3 de la Figura 4) muestran lo enorme que puede ser la influencia de los lípidos sobre la

calidad de los datos. La precipitación de proteínas, aunque eficiente para eliminar proteínas abundantes en la matriz biológica, no elimina los fosfolípidos, que pueden provocar una importante supresión iónica (consulte la nota de aplicación 5991-8007EN³).

La consecuencia de unos datos de mala calidad es una reducción sensible de la productividad global del laboratorio.

A continuación se incluye una lista con algunos de los efectos que una eliminación de matriz deficiente puede tener sobre la productividad del análisis por LC/MS/MS o GC/MS/MS:

Fiabilidad y calidad de los datos del método

- Sensibilidad y selectividad inaceptables de los métodos
- Linealidad inaceptable de la calibración
- Exactitud y precisión deficientes de los métodos
- Difícil identificación e integración de picos

Aplicabilidad de los métodos

- Tiempos más largos de desarrollo y optimización de métodos
- Mayores necesidades de resolución de problemas asociadas a los métodos
- Detección variable en función de la matriz
- Más repeticiones de análisis de muestras

Limpieza del espectrómetro de masas

- Limpieza más frecuente de la fuente de iones MS
- Limpieza o sustitución más frecuentes de los capilares
- Pérdida de capacidad para establecer o mantener niveles de vacío
- Mayores necesidades de resolución de problemas

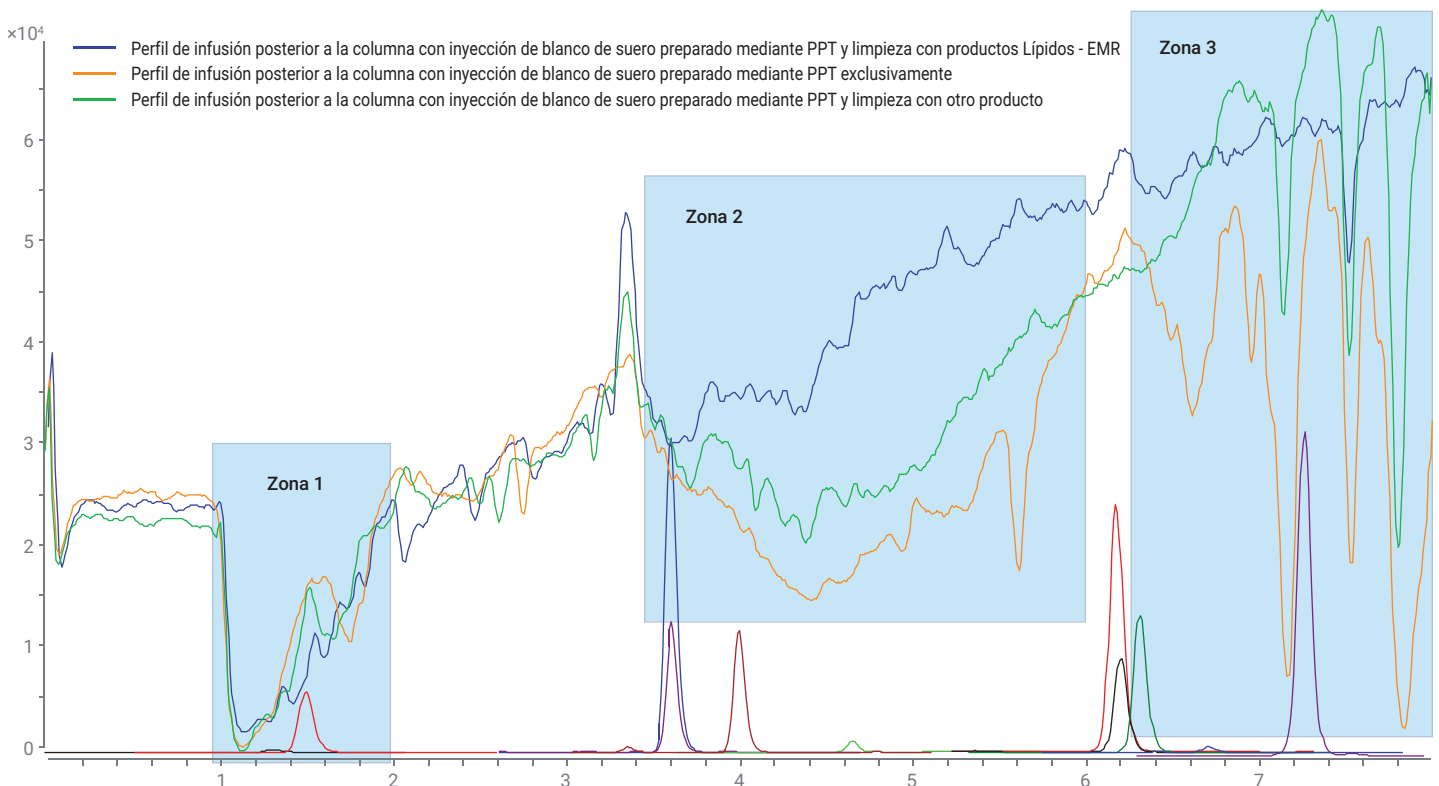


Figura 4. Comparación de perfiles estándar de un experimento de infusión posterior a la columna y demostración de la supresión iónica de la matriz en los analitos diana.

Acumulación de lípidos en la columna

- Reducción de la vida útil analítica de las columnas LC y GC
- Mantenimiento más frecuente del inyector de GC
- Recorte más frecuente de las columnas GC
- Retropresión en las columnas LC
- Lavado o equilibrado más frecuentes del sistema
- Mayores tiempos de análisis

Aunque existen flujos de trabajo para la extracción de lípidos, los métodos actuales de limpieza de muestras con frecuencia sacrifican la recuperación de los analitos, al extraer algunos de los analitos diana junto con los lípidos. Muchos analistas han aprendido a convivir con esta situación realizando más tareas de mantenimiento, cambiando los consumibles con mayor frecuencia o implementando técnicas de preparación de muestras más laboriosas. Esto último mejora la calidad de los datos, pero requiere experiencia e incrementa sensiblemente el coste y el tiempo, lo que a su vez reduce la productividad.

Motivos por los que limitarse a una preparación de muestras "suficientemente buena" no es una solución viable

Con el fin de poder obtener datos de mayor calidad y de mejorar significativamente la productividad, es deseable disponer de una metodología mejor y más sencilla para la eliminación de lípidos y de matriz en general. Para conseguir estos objetivos, Agilent ha desarrollado los productos Lípidos - EMR Captiva, que limpian las muestras eficazmente y simplifican el flujo de trabajo. El planteamiento de los productos Lípidos - EMR Captiva es sencillo y puede aplicarse universalmente para reducir los efectos de las matrices con lípidos y conseguir una buena recuperación de analitos.

Al analizar muestras complejas, como matrices alimentarias o biológicas, debe decidirse qué técnicas de preparación de muestras funcionan mejor para sus analitos diana. Muchas técnicas son complejas, laboriosas o requieren mucho tiempo y, aun así, pueden presentar problemas de recuperación de compuestos o interferencias de la matriz. Un requisito habitual en el campo de la preparación de muestras es el uso de protocolos más sencillos, con menos pasos. La limpieza de muestras debe eliminar eficazmente las interferencias de la matriz y minimizar el impacto sobre la recuperación de una gran variedad de analitos.

Tabla 1. Comparación entre la PPT convencional por centrifugación en placa (placa de 96 pocillos) y la PPT por filtración con limpieza con productos Lípidos - EMR Captiva de Agilent (placa de 96 pocillos).

PPT convencional (placa de 96 pocillos) (Centrifugación)			PPT + limpieza con productos Lípidos - EMR Captiva (placa de 96 pocillos) (Filtración)		
Paso	Tiempo necesario (min)	Consumibles necesarios	Paso	Tiempo necesario (min)	Consumibles necesarios
Etiquetado de placas y obtención de alícuotas de la muestra	30	96 puntas (pequeñas) 1 placa de recogida	Etiquetado de placas y obtención de alícuotas de la muestra	30	96 puntas (pequeñas) 1 placa de recogida 1 placa Lípidos - EMR
Adición del patrón interno	5	1 punta repetidora	Adición del patrón interno	5	1 punta repetidora
Mezcla de la muestra	2	Tapa de placa	Mezcla de la muestra	2	Tapa de placa
Adición de disolvente de separación	5	1 punta repetidora	Adición de disolvente de separación	5	1 punta repetidora
Mezcla de la muestra	5	Tapa de placa	Mezcla de la muestra	5	La tapa de la placa solo se necesita si hay mezcla activa
Centrifugación	10		Filtración	10	
Transferencia de sobrenadante y etiquetado de la placa de recogida	30	96 puntas (medianas) 1 placa de recogida		Variable	1 almohadilla de placa
Tratamiento posterior de la muestra	Variable	1 almohadilla de placa	Tratamiento posterior de la muestra		
Tiempo total necesario para la preparación de muestras	87 minutos, incluido el tratamiento posterior		Tiempo total necesario para la preparación de muestras	57 minutos, incluido el tratamiento posterior (ahorro de tiempo de aprox. un 30 %)	
Tiempo de funcionamiento de instrumentos y uso de disolvente	100 %		Tiempo de funcionamiento de instrumentos y uso de disolvente	< 90 % (ahorro mínimo de un 10 % de tiempo y disolvente)	
Eliminación de matriz	Solo proteínas		Eliminación de matriz	Proteínas y lípidos	

Imagínese que tuviera que identificar compuestos de interés entre el sinfín de componentes de una matriz, como los que aparecen en la Figura 5 en los cromatogramas de barrido completo

de GC de un extracto de aguacate sin tratamiento posterior (deficiente), con limpieza con C18 (no lo suficientemente bueno) y con limpieza con productos Lípidos - EMR (óptimo).

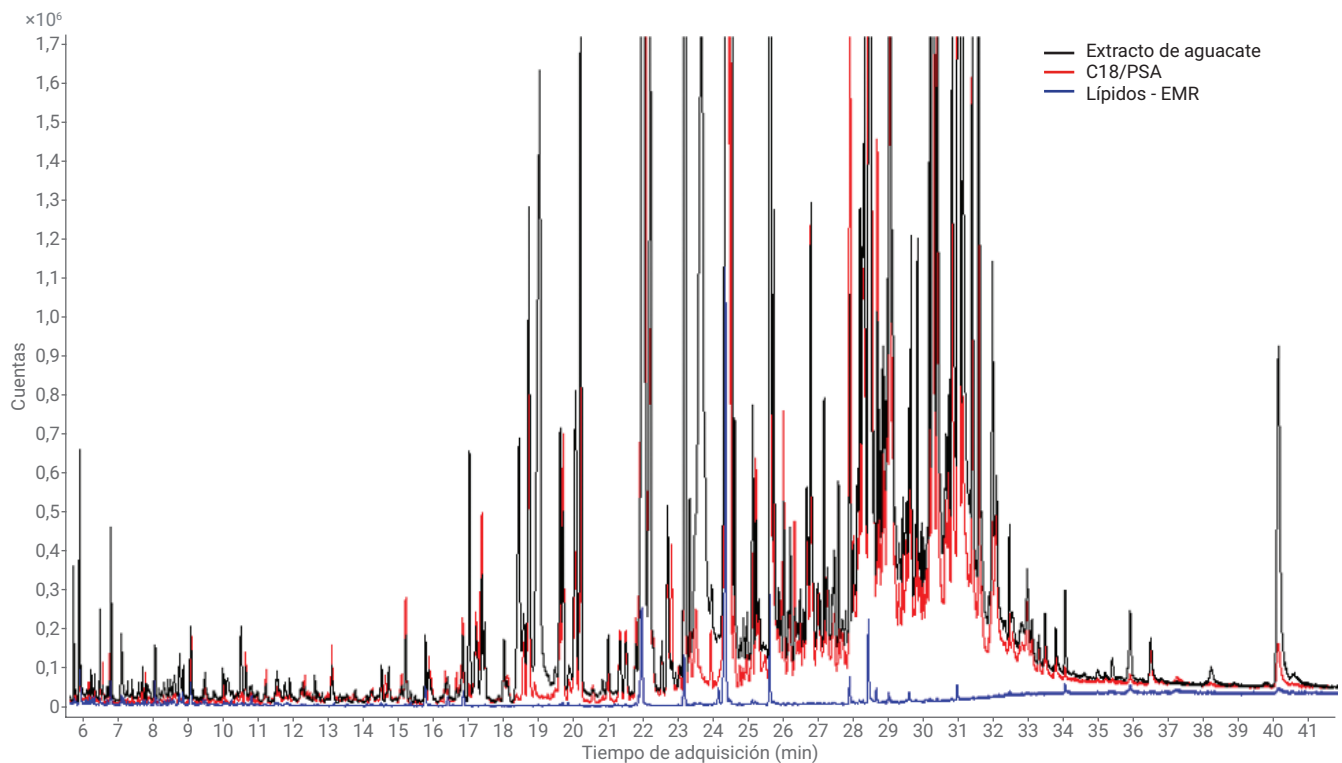


Figura 5. Superposición de cromatogramas de barrido completo de GC/MS de extractos de aguacate: QuEChERS no tratado (negro); con limpieza convencional con C18/PSA (rojo); y tratado con productos Lípidos - EMR de Agilent (azul).

Los lípidos pueden causar una importante supresión iónica de matriz y reducir la sensibilidad de detección y la reproducibilidad de los métodos. Los fosfolípidos de las matrices biológicas siempre resultan problemáticos, debido al drástico efecto de la matriz que provocan. En la Figura 6 se observa que una muestra sometida a limpieza con productos Lípidos - EMR Captiva ofrece una respuesta de los analitos mucho más alta y mejores valores de RSD que una muestra sometida solo a PPT al realizar un análisis de metabolitos de la vitamina D.

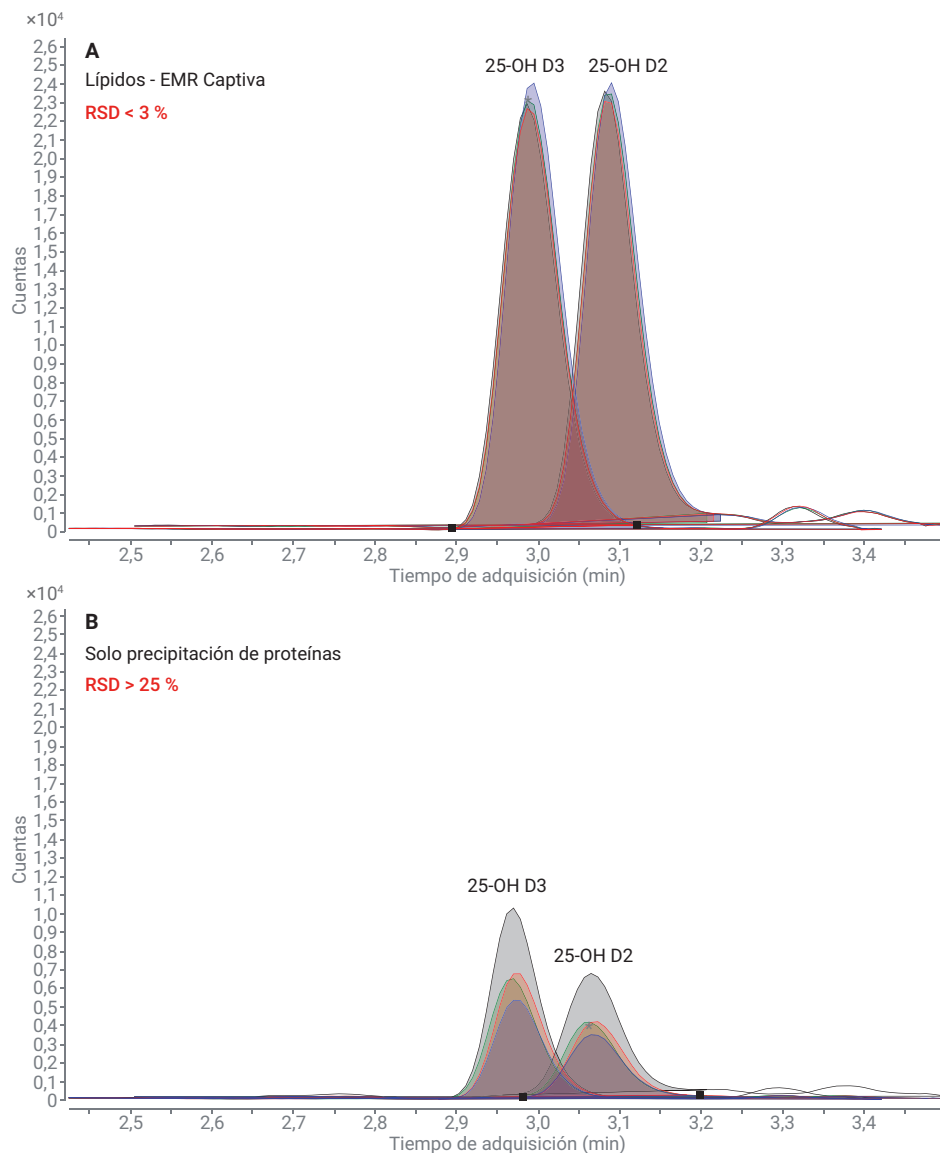


Figura 6. Comparación de la respuesta de los analitos y los valores de RSD para muestras limpiadas solamente por PPT y por PPT con productos Lípidos - EMR.

Ahora que podemos extraer lípidos eficazmente, ¿qué se puede hacer para acelerar el análisis?

Con los productos Lípidos - EMR Captiva, podrá mejorar la fiabilidad de los métodos analíticos y la calidad de los datos, y también reducir el tiempo de análisis y

mejorar la productividad del laboratorio. En el gráfico de la Figura 7 se observa que, gracias a la buena extracción de fosfolípidos antes de la introducción de la muestra, no es necesario esperar a que estos compuestos hidrófobos eluyan en la cromatografía de fase reversa, lo que ahorra un precioso tiempo de uso de los instrumentos.

Además, gracias a la purificación de las muestras, el análisis será más rápido

y no será necesario lavar el sistema con tanta frecuencia como antes. Otra ventaja de la purificación de las muestras es que podrá analizar más muestras antes de realizar el mantenimiento preventivo programado. Esto le permitirá aumentar la productividad manteniendo la capacidad actual de su laboratorio. En última instancia, esto se traducirá en una mejora de la cuenta de resultados de su laboratorio.

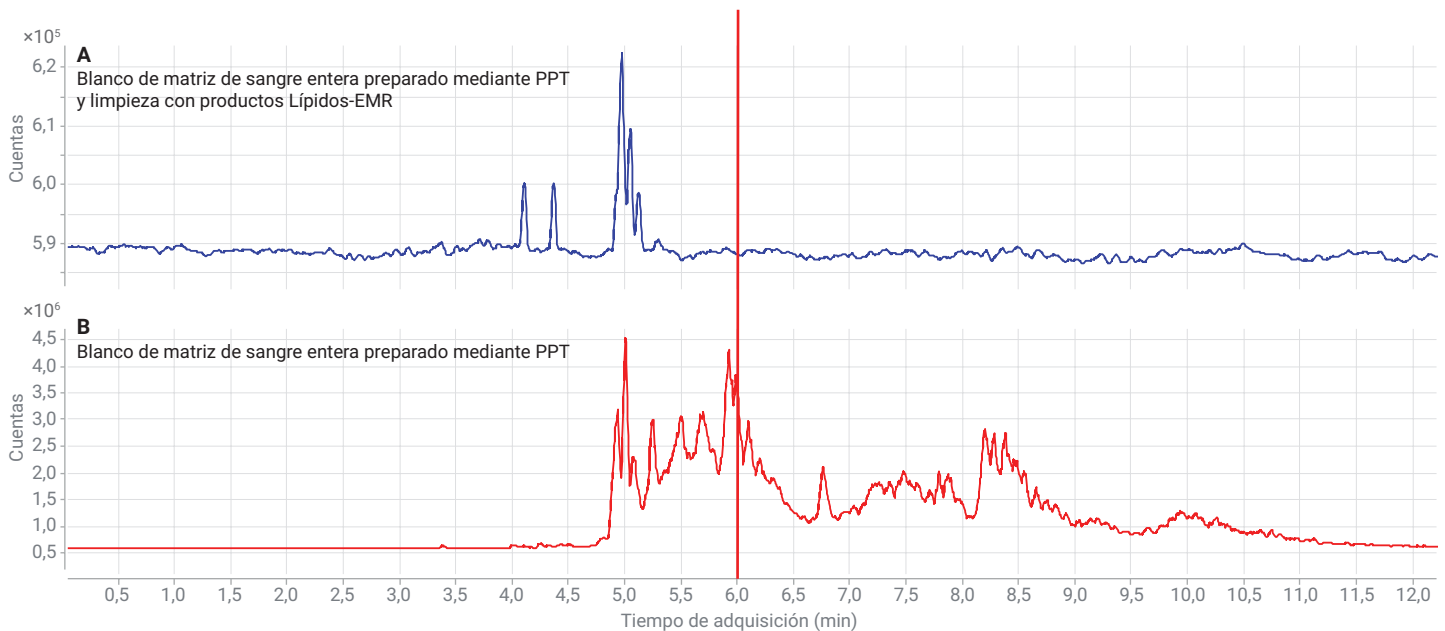


Figura 7. Comparación de perfiles de fosfolípidos de un blanco de matriz para demostrar la viabilidad de acortar la duración del ciclo de análisis.

Conclusiones

¿Por qué es tan importante la limpieza de muestras? Porque la matriz de las muestras complejas contiene numerosos componentes problemáticos, como lípidos, proteínas, sales, pigmentos, etc. Los lípidos son unos de los componentes más problemáticos de la matriz por varias razones.

Las ventajas de usar un flujo de trabajo mejorado de preparación de muestras frente a uno lo "suficientemente bueno" son muchas: más horas de tiempo de actividad de los instrumentos, menos tiempo de trabajo de los analistas en el laboratorio y la posibilidad de reducir el tiempo de análisis cromatográfico y analizar más muestras cada día. En última instancia, la causa de tener que realizar un mantenimiento periódico es la contaminación provocada por la matriz. Si elimina más matriz, reducirá la frecuencia de las tareas de

mantenimiento. Para ello, no tendrá que cambiar sus SOP ni asignar más tiempo al flujo de trabajo. Sin preparación de muestras, es posible que no vea los picos de interés con suficiente claridad como para poder cuantificarlos con exactitud. En realidad, es posible que ni siquiera los vea. Todos estos efectos pueden aumentar el tiempo necesario para procesar los datos y el número de repeticiones de análisis de muestras y lotes de muestras debido a la deficiente calidad de los datos.

Más información sobre los productos Lípidos - EMR Captiva de Agilent

[www.agilent.com/chem/
Captiva-EMR-Lipid](http://www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid)



Limpieza con productos Lípidos - EMR Captiva de Agilent

Obtenga más información sobre cómo aumentar la productividad con la solución de preparación de muestras de Agilent

www.agilent.com/chem/did-you-know

Notas de aplicación recomendadas

1. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-9251EN.
2. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Captiva EMR—Lipid 96-Well Plates, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-9222EN.
3. Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum with Captiva EMR—Lipid Cleanup, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-8007EN.
4. Vitamin D Metabolite Analysis in Biological Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-7956EN.
5. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef, *nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-8598EN.

¿Tiene interés en el análisis de fármacos de uso veterinario? También puede consultar el siguiente artículo del *Journal of Chromatography A*.

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, volumen 1549, 14-24.

www.agilent.com/chem/sampleprep

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
Impreso en EE. UU., 6 de agosto de 2018
5994-0110ES